基于Qbeta噬菌体装甲RNA技术的诺如病毒RNA标准参考样品的研制[1]

张奇[1]，姚琳[2]，江艳华[2]，李风铃[2]，张媛[3]，许东勤[1]，朱文嘉[2]，郭莹莹[2]，王联珠[2**]，翟毓秀[2]

（1 上海海洋大学 上海 201306 ）

（2 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 农业部水产品质量安全风险评估实验室（青岛） 山东 青岛 266071 ）

（3 獐子岛集团股份有限公司 辽宁 大连 116001）

摘要 目的：针对目前检测领域缺乏诺如病毒（Norovirus, NoV）核酸标准样品这一瓶颈，本研究基于Qbeta噬菌体装甲RNA技术构建内含GII型NoV检测靶标RNA的病毒样颗粒（Virus like particles, VLPs）标准参考样品。方法：人工合成包含Qbeta噬菌体成熟酶编码基因、衣壳蛋白编码基因、包装位点、ISO/T15216-2 2012中规定的GII型NoV检测靶标对应的cDNA序列及辅助多克隆位点的DNA片段QINVGII，将其克隆到pET-28a(+)载体中，构建重组质粒pET-QINVGII。将pET-QINVGII转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞并诱导表达。表达产物经SDS-PAGE和透射电镜分析后，利用氯化铯密度梯度离心，制备纯化VLPs，并对纯化后的VLPs开展均匀性、稳定性及定值研究。结果：SDS-PAGE结果证实重组大肠杆菌在14.1 kDa左右有目的条带表达；透射电镜下可观察到大量结构完整，直径约为25 nm的VLPs。定值结果显示，本研究制备的VLPs样品中GII型NoV检测靶标RNA的含量为（1.06±0.06）×10^7 copies/μl；均匀性分析结果表明样品均匀性良好，即$F=2.24<F_{0.05}(9, 20)$；稳定性结果表明，本研究制备的VLPs在37℃可保存12天、室温（20-25℃）可保存24天、4℃至少可保存90天、-20℃至少可保存200天、-80℃至少可保存300天。结论：本研究基于Qbeta噬菌体制备的NoV装甲RNA均匀性和稳定性良好，拷贝数高，为NoV分子检测提供了良好的标准参考样品。

关键词：诺如病毒 装甲RNA Qbeta噬菌体 标准参考样品 实时荧光定量RT-PCR

中图分类号：Q33

Development of Armored RNA reference material of Norovirus based on Qbeta bacteriophage

ZHANG Qi[1], YAO Lin[2], JIANG Yan-hua[2], LI Feng-ling[2], ZHANG Yuan[3], XU Dong-qin[1], ZHU Wen-jia[2], GUO Ying-ying[2], WANG Lian-zhu[2], ZHAI Yu-xiu[2]

（1 Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306，China.）

（ 2 Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality，Ministry of Agriculture, P. R. China; Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for aquatic products (Qingdao), Ministry of Agriculture, P. R. China，Shandong Qingdao，China. ）

*基金项目：中国水产科学研究院基本科研业务费重点项目（2016HY-ZD11），科技部科技基础性工作专项（2013FY113300），国家科技支撑计划（2015BAD17B03）

**通信作者，E-mail：wanglz@ysfri.ac.cn

（3 ZHANGZIDAO Group Co., LTD, Liaoning Dalian 116001.）

Abstract Objective: To develop armored RNA reference material containing target RNA of norovirus based on Qbeta bacteriophage for norovirus nucleic acid detection. Methods: Synthesize DNA fragment named QINVGII containing maturase coding gene, capsid protein coding gene and packing site of Qbeta bacteriophage, cDNA corresponding detection target sequence of gene group II norovirus in ISO/T15216-2 2012. QINVGII fragment was cloned into prokaryotic expression vector pET-28a (+). The recombinant plasmid was identified by enzyme digestion and sequencing, and then expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells through isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. The expression product, VLPs was analyzed by SDS-PAGE and the electron microscope. The VLPs was centrifuged and purified by CsCl density gradient after digestion with DNase I and RNase A. The homogeneity and stability of the reference material were tested according to the GB/T15000.3-2008 (Directives for the work of reference materials (3) - Reference material -General and statistical principles for certification.). Results: SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the expressed protein product was about 14.1 kDa, which was consistent with the prediction. The 25 nm VLPs could be observed under electron microscope. The VLPs samples were valued as (1.06±0.06)×10^7 copies/μl and behaved well in the homogeneity test, F=2.24＜$F_{0.05}$(9,20). The stability test indicated that the sample was stable at 37℃ for 12 days, at room temperature (20-25℃) for 24 days, at 4℃ for at least 120 days, -20℃ for at least 150 days, at -80℃ for at least 300 days with no significant decrease. Conclusion: The armored RNA based on Qbeta bacteriophage prepared in this study, which had good uniformity, stability and high copy number, could be a good reference material candidate for the norovirus RNA detection.

Keyword: Norovirus Armored RNA Qbeta bacteriophage reference material real-time RT-PCR

诺如病毒（Norovirus, NoV）是引起人类急性肠胃炎的主要病原之一。有研究表明，发达国家有超过90%的非菌性急性肠胃炎由 NoV 引起[1]，2006 年~2007 年，日本和英国相继暴发 NoV 疫情，近百万人受到感染。发展中国家每年因 NoV 感染而导致死亡的儿童高达 21.8 万[2]。我国自 1990 年首次发现 NoV 感染病例以来，北京[3]、广东[4]、上海[5]等地区报道多起 NoV 集体感染病例，NoV 成为影响我国食品安全与公共卫生的重要因素。

NoV 可以通过人-人直接传染，也可通过受污染贝类、果蔬类等食品传播。与临床腹泻样本不同的是，受污染食品中 NoV 含量很低，目前实时荧光 RT-PCR 是检测食品中 NoV 的最主要方法。由于食品样本的基质复杂，存在多种抑制因子，影响病毒提取、裂解、反转录、PCR 扩增等多个环节。为了确保检测结果的准确性和可靠性，在检测过程中需加入标准样品作为质控品，用于测量评估和质量控制，同时也可实现不同实验室间检测结果的可比性和溯源性。国内外食源

性病毒的检测过程中，早期主要采用临床阳性腹泻样本作为质控品，但存在病毒含量不均一、有严重的生物安全隐患、样本不易获得等缺陷；近年来有研究者采用质粒 DNA 或体外转录的裸露 RNA 片段作为标准样品，但不能评价病毒粒子裂解效率、提取效率、反转录效率等关键环节，且易降解、易污染。

针对上述瓶颈，有研究人员开发出了装甲 RNA（Amored RNA）技术[6]，该技术是将 MS2 噬菌体衣壳蛋白编码基因、成熟酶蛋白编码基因、包装位点和复制酶起始位点的 cDNA 序列克隆到原核表达载体上，同时在下游插入外源 RNA 的 cDNA 序列，在大肠杆菌体内经转录翻译后，自动组装形成噬菌体病毒样颗粒（Virus like particles, VLPs），并将外源 RNA 包装到粒子内部，形成装甲 RNA。装甲 RNA 具有无生物传染性、可评价整个检测过程、耐受 RNase 的降解，稳定性好、易保存、能定量、易制备，适于运输等优点[7, 8]，现已成功用于制备人类免疫缺陷病毒[9]、风疹病毒[10]、肠道病毒[11]、丙型肝炎[12]、流感病毒[13]等病毒的 RNA 检测用标准样品。

本研究研发了基于 Qbeta 噬菌体的装甲 RNA 制备平台，研制了内含 GII 型 NoV 检测靶标的 VLPs 即装甲 RNA，并开展均匀性、稳定性与定值研究，可做为质检及医疗等机构的标准参考样品，同时也为保障食品安全和控制公共卫生事件的发生提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

大肠杆菌 BL21(DE3)和 Top10 购自天根生化科技有限公司，原核表达载体 pET-28a(+)为本室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器

克隆试剂盒 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司；限制性内切酶 *BamH* I、*Xho* I，Takara One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit，DNA 凝胶回收试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司；卡那霉素（Kana）和异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG）购自北京索莱宝生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

实时荧光 PCR 仪为美国 Roche 公司 LightCycler 2.0。

1.2 方法

1.2.1 引物和荧光探针的设计与合成

引物与探针由上海生工生物工程有限公司合成，名称及用途见表 1。

表 1 引物、探针信息

Table 1 Information of primers and probe

引物与探针	序列（5'-3'）	用途
P1	GACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGG ATCCGGGGACCCCCTTTAG	QINVGII 片段 PCR 扩增
P2	GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTGC GGCCGCTCTAGAGCATGC	
PpqiNVF	GACAGCATAAGCTTTTTCC	VLPs 残留 DNA 检测
PpqiNVR	GCGGCCGCTCTAGAGCAC	
QNIF2	ATGTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	
COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	GII 型 NoV 实时荧光
QNIFs(Probe）	AGCACGTGGGAGGGCGATCG	RT-PCR 检测[14]

1.2.2 目的片段 QINVGII 的合成

参考 Genbank 数据库中的 Qbeta 噬菌体基因组序列（AB971354）以及 ISO/T 15216-2 2012 （ Microbiology of food and animal feed -Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 2: Method for qualitative detection)中所规定的 GII 型 NoV 检测靶标对应的 cDNA 序列，由上海生工生物工程有限公司人工合成包含 Qbeta 噬菌体成熟酶编码基因、衣壳蛋白编码基因、包装位点、GII 型 NoV 检测靶标 cDNA 序列及辅助多克隆位点的核酸片段，命名为 QINVGII。

1.2.3 QINVGII 的 PCR 扩增

PCR 扩增 QINVGII 片段，反应体系与扩增条件如下：引物 P1(10 μM)、P2(10 μM)各 1.0 μl，dNTP mixture 2.0 μl，10×PCR buffer 5.0 μl，$MgCl_2$(25 mM) 4.0 μl，*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl) 0.4 μl，模板 pMD-QINVGII 1.0 μl，ddH_2O 35.6 μl；扩增条件：预变性 95℃ 5 min；95℃ 1 min，50℃ 40 s，72℃ 40 s，30 个循环；72℃ 5 min，琼脂糖凝胶电泳分析，凝胶回收试剂盒纯化目的片段。

1.2.4 重组质粒 PET-QINVGII 的构建与鉴定

用限制性内切酶 *BamH* I 与 *Xho* I 双酶切 pET-28a(+)载体，将纯化后的 QINVGII 在重组酶作用下，亚克隆到 pET-28a(+)载体中，构建重组质粒 pET-QINVGII。反应体系与条件如下：pET-28a(+)酶切产物(约 50 ng/μl) 1.0 μl，QINVGII(约 20 ng/μl) 1.0 μl，5×CE II Buffer 4.0 μl，Exnase®II 2.0 μl，ddH_2O 12.0

μl。用 *Not* I 单酶切和 *Not* I 和 *BamH* I 双酶切鉴定筛选阳性重组质粒，送至上海生工生物工程有限公司测序验证。

1.2.5 病毒样颗粒的诱导表达

将 pET-QINVGII 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，在含 kana（终浓度为 0.05mg/ml）的 LB 培养基上进行涂布，37℃培养过夜后挑取单菌落，接种到 5 ml 含 kana 的 LB 培养基中 37℃振荡培养过夜，取 200 μl 活化后的菌液接种于 20 ml 含 kana 的 LB 培养基中，37℃，180 rpm 振荡培养至 OD_{600nm} 约为 0.6，加入 IPTG（终浓度为 0.8mM）诱导 12 h，离心收集菌液，进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 病毒样颗粒的制备与纯化

取 2 ml 活化后的菌液接种于 200 ml 含 kana（终浓度为 0.05 mg/ml）的 LB 培养基中，37℃，180 rpm 振荡培养至 OD_{600nm} 约为 0.6，加入 IPTG（终浓度为 0.8mM）诱导表达 12 h，离心收集菌液，超声波破碎，4℃，11000 rpm 离心 20 min，收集上清后分别加入 DNaseI 和 RNaseA 消化，用 0.45 μm 滤膜过滤，向每克滤液中加入 0.6 g 的氯化铯进行密度梯度超速离心，4℃，80000 rpm 离心 5 h，得到纯化后的 VLPs，即装甲 RNA。

1.2.7 电子显微镜观察

2%磷钨酸负染，用 JEM-1200 型透射电镜在 400 000 倍下观察 VLPs。

1.2.8 病毒样颗粒中残留质粒的检测

用 PCR 法检测制备的 VLPs 是否含有残留质粒 pET-QINVGII。反应体系与扩增条件如下：引物 PpqiNVF(10 μM)、PpqiNVR(10 μM)各 1.0 μl，dNTP mixture 2.0 μl，10×PCR buffer 5.0 μl，$MgCl_2$(25 mM)4.0 μl，*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl) 0.4 μl，模板(即纯化后的 VLPs)1.0 μl，ddH_2O 35.6 μl；扩增条件：预变性 95℃ 5 min；95℃ 1 min，50℃ 40 s，72℃ 40 s，35 个循环；72℃ 5 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.9 定值

用 Trizol 试剂提取 VLPs 中的 RNA，核酸蛋白测定仪测定浓度。按照拷贝数 =（6.02×10^{23} 拷贝/mol）×RNA 含量（ng/μl）×（10^{-9}）/（片段长度（bp）×340），计算其拷贝数。提取的 RNA 进行 10 倍系列梯度稀释，使用 Takara One Step Primescript^{TM} RT-PCR kit 试剂盒进行实时荧光 RT-PCR 检测，体系和循环参数如下：2×one step RT-PCR Buffer Ⅲ 10.0 μl，*Takara Ex Taq* HS(5 U/μl) 0.4 μl，

PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μl，引物 QNIF2 、COG2R 各 0.3 μl，探针 QNIFs 0.4 μl，RNA 2.0 μl，RNase-Free H_2O 6.2 μl；循环参数为 42℃ 5 min，95℃ 10 sec；95℃ 5 sec，60℃ 20 sec，40 个循环。根据所测得的 Ct 值与各梯度拷贝数的对数绘制标准曲线，建立标准回归方程。随机选取 15 管 VLPs，采用实时荧光 RT-PCR 方法测定 Ct 值，根据建立的标准曲线间接计算 VLPs 拷贝数。

1.2.10 均匀性实验

随机抽样 10 瓶样品，编号为 1#~10#，参考 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则》[15]要求，按 1.2.9 进行检测，单因素方差分析样本均匀性。

1.2.11 稳定性实验

将 VLPs 分别置于 37℃、室温（20-25℃）、4℃、-20℃、-80℃保存不同天数，稳定性检验的时间按照先密后疏的原则安排[16]。按 1.2.9 进行检测，每管重复 3 次，单因素方差和线性回归方法统计样本的稳定性。

1.2.12 不确定度分析

按国家计量技术规范 JJF 1059-1999《测量不确定度表示指南》[17]中规定分析。

2 结果

2.1 QINVGII 的 PCR 扩增

用 0.8%琼脂糖凝胶对含有 Qbeta 噬菌体衣壳蛋白编码基因等序列的扩增产物 QINVGII 进行电泳分析，结果显示产物大小约为 2500 bp，与目标片段的预期大小一致。扩增产物电泳结果如图 1 所示。

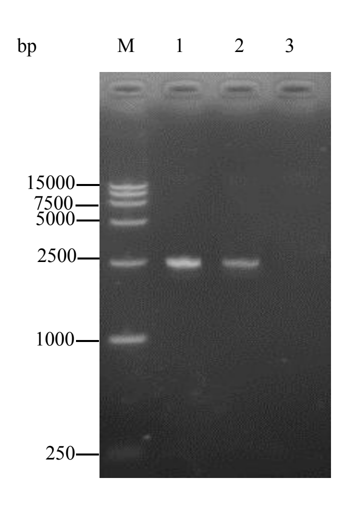


图 1 QINVGII 片段 PCR 扩增

M: DNA 分子量 DL15000; 1-2: QINVGII PCR 扩增产物; 3: 阴性对照.

Fig1 PCR amplification of QINVGII.

M: DNA marker DL15000; line 1-2: QINVGII PCR products; line 3: Negative control.

2.2 pET-QINVGII 重组质粒构建与鉴定

将QINVGII片段亚克隆至pET-28a(+)，构建原核表达重组质粒，用限制性内切酶*Not* I单酶切和*Not* I/*BamH* I双酶切鉴定，证实重组质粒构建成功，命名为pET-QINVGII，酶切鉴定结果如图2。

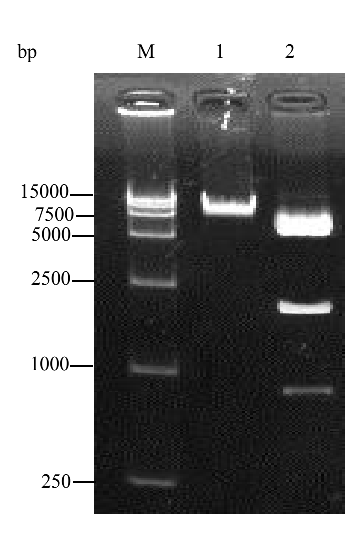


图 2 pET-QINVGII 的酶切鉴定图

M: DNA 分子量 DL15000；1：*Not* I 单酶切 pET-QINVGII；2：Not I /BamH I 双酶切 pET-QINVGII

Fig 2 Identification of pET-QINVGII by restriction analysis

M: DNA marker DL15000; 1: pET-QINVGII /Not I digestion; 2: pET-QINVGII /Not I and *BamH I* digestion.

2.3 pET-QINVGII 在大肠杆菌中的诱导表达

pET-QINVGII 在大肠杆菌 BL21 中经 IPTG 诱导表达，在约 14.1kD 处出现一条明显的重组蛋白质条带（图 3），与预期大小一致。

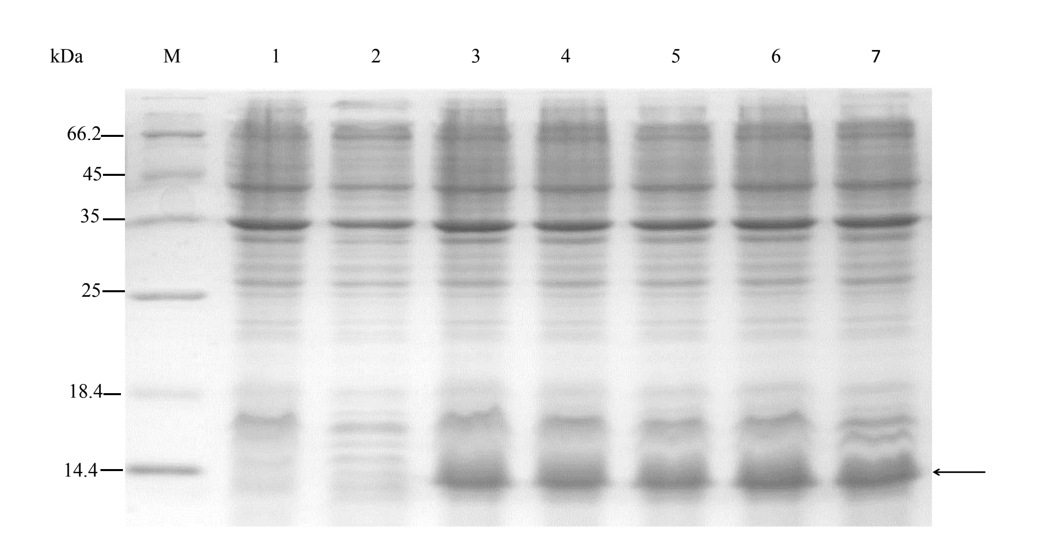


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白质分子量 Marker；1 大肠杆菌 BL21(DE3)菌体蛋白；2 pET28 a(+)空载体菌体蛋白；3-7 诱导表达的重组菌体蛋白

Fig3 SDS-PAGE analysis of VLPs expression

M: Protein relative molecular mass Marker; 1: Negative control of BL21 (DE3); 2: Negative control of BL21 (DE3) transformed by pET28a (+); 3-7: Recombination protein induced by IPTG

2.4 病毒样颗粒的电镜观察及纯度分析

2.4.1 电镜观察

VLPs经超离纯化后，在电镜下观察，可看到大量结构完整、大小均一的VLPs，直径约25 nm，与预期大小一致，结果如图4。

2.4.2 纯化后病毒样颗粒 DNA 残留检测结果

0.8%琼脂糖凝胶电泳对以 VLPs 为模板的 PCR 扩增产物进行分析，以 pET-QINVGII 为模板的阳性对照孔出现大小为 150 bp 的目的条带，以 VLPs 为模板的实验孔未见扩增条带，说明制备的 VLPs 中无质粒 DNA 的残留，不会对后续检测造成影响，结果见图 5。

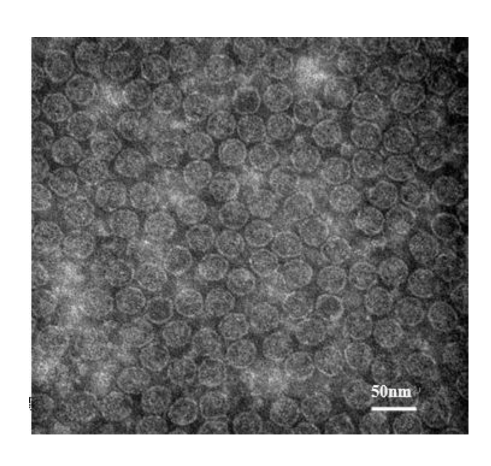


图 4 VLPs 电镜照片 400 000×

Fig 4 Electron microscopy of VLPs 400 000×

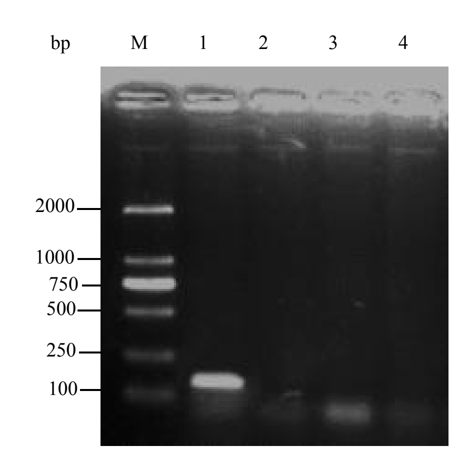


图 5 VLPs 中残留质粒检测电泳图

M: DL2000；1: 阳性对照；2: 阴性对照；3-4: VLPs 的 PCR 扩增

Fig 5 Agarose gel analysis of residual plasmid detection in VLPs

M: DNA marker DL2000; 1: Positive control; 2: Negative control; 3- 4: PCR products of VLPs.

2.5 定值

用Trizol法提取VLPs中包含的GII型NoV检测靶标RNA，随后进行10倍梯度稀释。以梯度稀释的RNA为模板进行实时荧光RT-PCR检测，根据样品所提取RNA各稀释梯度和Ct值，绘制标准曲线y= -3.562x+37.938，R^2=0.999。定值结果为(1.06±0.06)×10^7 copies/μl，详见表4。

2.6 均匀性及稳定性分析

随机抽样 10 瓶样品，参考 GB/T 15000.3-2008《标准样品工作导则》要求，进行实时荧光 RT-PCR 检测，并将检测结果进行单因素方差分析。根据给定的显著性水平 α 和自由度，查 F 分布表可得临界值 F_{α} 值，与由公式 F=Msamong/Mswithin 计算所得的 F 值相比较，若 $F < F_{\alpha}$，则认为组内和组间无明显结果差异。均匀性检验结果显示：根据自由度（9，20）以及显著水平α=0.05，可由 F 分布表查得临界的 $F_{0.05}(9，20)=2.39$。$F=2.24 < F_{0.05}(9，20)$，组内和组间无明显差异，证实本研究制备的 NoV 标准参考样品是均匀的，结果见表 2。

对不同保存条件与时间的标准参考样品进行实时荧光 RT-PCR 检测，并将检测结果进行单因素方差和线性回归方法统计分析。稳定性实验结果显示：本实验制备的 NoV 标准参考样品在 37℃可稳定性保存 12 天；室温（20-25℃）可稳定性保存 24 天；4℃可稳定性保存至少 90 天；-20℃可稳定性保存至少 150 天；-80℃可稳定存在至少 300 天。

表 2 均匀性实验的方差分析

Tab 2 Variance analysis of homogeneity test

变差源	平方和 ss	自由度	均方 Ms	F	$F_{0.05}$（9,20）
组间	$1.11×10^{14}$	9	$1.22×10^{13}$	2.24	2.39
组内	$1.10×10^{14}$	20	$5.49×10^{12}$		
总和	$2.20×10^{14}$	29			

表 3 VLPs 稳定性实验结果

Tab 3 Trend test for stability of Norovirus VLPs

温度	拟合方程	斜率 b_1	斜率的不确定度 s(b1)	自由度 n-2	$t_{0.95}$，(n-2)	$\|b1\|-t_{0.95,(n-2)}×s(b1)$	趋势
37℃	Y=（$-3.00×10^5$）X＋$1.10×10^7$	$-3.00×10^5$	$2.17×10^5$	3	3.18	$-3.90×10^5<0$	未观测到不稳定性
室温	Y=（$-1.54×10^5$）X＋$1.10×10^7$	$-1.54×10^5$	$1.85×10^5$	7	2.36	$-2.82×10^5<0$	未观测到不稳定性
4℃	Y=（$-1.27×10^4$）X＋$1.00×10^7$	$-1.27×10^4$	$3.35×10^4$	6	2.45	$-6,50×10^4<0$	未观测到不稳定性
-20℃	Y=（$-8.44×10^3$）X＋$9.75×10^6$	$-8.446×10^3$	$9.14×10^4$	10	2.23	$-1.19×10^4<0$	未观测到不稳定性
-80℃	Y=（$-4.90×10^3$）X＋$1.15×10^7$	$-4.90×10^3$	$4.90×10^4$	15	2.12	$-1.53×10^4<0$	未观测到不稳定性

2.7 不确定分析

经 Grubbs 法检验无异常，应用 A 类不确定度评定方法进行评定，采用公式 $U(\bar{\bar{x}}) = \pm t_{\alpha}(m-1)\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{m}(\bar{x}-\bar{\bar{x}})^2}{m(m-1)}}$ 计算所得 NoV 标准样品的不确定度为 0.06×10^7 copies/μl，定值为 $(1.06\pm0.06)\times10^7$ copies/μl，结果见表 4。

表4 VLPs定值结果分析

Tab 4 Valuation of VLPs

$\bar{x}$	s	自由度	置信概率	tα（v）	定值结果
1.06×10^7	9.47×10^5	14	95%	2，14	$(1.06\pm0.06)\times10^7$

3 讨论

最大限度模拟病毒粒子裂解、RNA 提取、反转录等检测关键环节是制备 RNA 类病毒核酸标准参考样品的努力方向[18]。利用装甲 RNA 技术制备的 VLPs 标准参考样品能满足上述要求，保证实验结果的可靠性和可比性，还可用于实验室的能力验证等多个领域。

装甲 RNA 技术最初是基于 MS2 噬菌体研发出的一种制备核酸标准参考/质控样品的新思路，有研究者以 MS2 噬菌体为平台成功构建包含艾滋病病毒[19]、寨卡病毒[20]、猴免疫缺陷病毒[21]等病毒核酸片段的 VLPs 即装甲 RNA。有研究表明，III 型的 Qbeta 噬菌体的衣壳蛋白比 I 型的 MS2 的稳定性更高，理论上讲，基于 Qbeta 噬菌体构建的装甲 RNA 更适用于标准样品的制备、运输、储存与使用；Qbeta 噬菌体可以获得嵌合体粒子，更有利于 C 末端的延伸，相比 MS2 更有应用前景[22, 23]。前期研究证实，利用 MS2 噬菌体制备轮状病毒[24]和戊型肝炎病毒[25]的 VLPs 在-20℃可分别稳定保存 10 天和 120 天，本研究利用 Qbeta 噬菌体制备的 NoV VLPs 在室温和-20℃可分别稳定保存至少 24 天和 200 天，也在一定程度上证实 Qbeta 噬菌体制备 VLPs 的稳定性略高于 MS2 噬菌体制备 VLPs。

NoV 共分为 GI、GII、GIII、GIV、GV5 种基因组，其中 GII 型 NoV 在世界范围的暴发流行中最常见，Yu 等[26]对我国 27 个省 3948 例 NoV 感染样本进行基因型分析，结果表明有 89.9%样本属于 GII 型 NoV。因此本研究利用 Qbeta 噬菌体装甲 RNA 技术，制备内含 GII 型 NoV 检测靶标 RNA 的标准参考样品。VLPs 在制备中可能混有细菌蛋白、基因组等，它们的存在可能影响标准样品的质量，

在小量制备中采用 CsCl 密度梯度超高速冷冻离心纯化 VLPs，电镜观察到大量结构完整，纯度良好的 VLPs，PCR 实验未检测到残留质粒，可以满足标准样品的要求。有报道使用分子筛层析[27]、组氨酸蛋白标签技术[28]等方式纯化 VLPs，在后期商品化大量制备中可根据需要进一步纯化。

化学物质的标准样品或标准物质定值无论从技术上还是从评价指标上都更为成熟，并且有含量精准的一级、二级标准物质作为量值溯源与量值传递的核心基础，能较顺利完成所研发标准样品或标准物质的定值。而抗体、核酸等生物类样本，由于成分复杂，检测原理的差异，评价指标不统一，目前尚达不到化学物质标准样品的定值精度，现有研究也处在不断探索的过程中。徐蕾蕊等[29]对其制备的星状病毒核酸标准样品采用实时荧光RT-PCR方法和数字PCR方法联合定值的策略，数字PCR可实现对核酸的绝对定量，不再依赖于Ct值、标准曲线等参数，拥有高灵敏度和精密度，具有更广阔的研究与应用前景；王璐楠[30]和蒋玲丽等[31]对其研制的丙型肝炎病毒核酸检测标准样品采用与国际标准比对的方式进行定值，以连续的比较链与现有的标准样品联系起来，保证了研制的标准样品的溯源性；孙涛等[32]制备的O型口蹄疫病毒核酸检测标准样品和那晗等[33]制备的肠侵袭性大肠埃希氏菌核酸标准样品的定值采用多个实验室协作定值，这也是标准样品定值测量最常用的方法，鼓励参与实验室间协作研究的实验室尽可能多地采用独立的分析方法，这样做可将引起正或负偏差的未知潜在系统误差置于同一水平。在后续实验中，可联合使用数字PCR和协作定值的方式对标准参考样品进行进一步精确定值。

我国标准物质管理办法规定定值结果表示为：标准值±总不确定度，总不确定度由 A 类和 B 类不确定度组成。A 类不确定度是指可以由测量结果统计分布计算。B 类不确定度的组成成分不是用统计方法算出，而是基于经验或者其他信息的概率分布估计的。A 类不确定度通过测量数据的标准偏差、测量次数以及所要求的置信概率按统计方法算出来。B 类不确定度主要来自于移液枪加样等测量影响因素所产生的的不确定度，在定值过程中已包含了此类不确定度，样品的 B 类不确定度不再单独计算。

综上所述，基于Qbeta噬菌体制备的内含GII型NoV检测靶标的VLPs即装甲RNA均匀性和稳定性良好，拷贝数高，可实现对NoV核酸检测中的核酸提取、反转录、扩增等过程的监控和定量分析，为NoV检测提供了良好的标准参考样品。

此外，本研究也为其它食源性病毒，甚至烈性传染病病毒的检测制备稳定性好，无生物安全隐患的核酸标准参考样品提供了新思路。

参考文献

[1] Belliot G, Lopman B A,Ambert-Balay K, *et al.* The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection. Clinical Microbiology & Infection, 2014, 20(8): 724-730.

[2] Patel M M, Widdowson M A,Glass R I, *et al.* Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(8): 1224-1231.

[3] 张海艳,徐文彩,郭建欣, *等.* 一起集体单位诺如病毒 GII 型腹泻暴发疫情调查. 首都公共卫生,2016,10(2): 89-92.

ZHANG H Y, XU W C, GUO J X, *et al.* An epidemiological investigation on an outbreak of diarrhea caused by norovirus GII at the collective Unit. Capital Journal of Public Health, 2016, 10(2): 89-92.

[4] 潘峰,沈宜聪,李智丹. 一起高校暴发诺如病毒感染性腹泻的调查. 保健医学研究与实践,2014,11(1):27-28.

PAN F, SHEN Y C, LI Z D. Investigation on outbreak of infectious diarrhea caused by norovirus in a university. Health Medicine Research and Practice, 2014, 11(1):27-28.

[5] 段蓉,刘景壹,沈红, *等.* 2013—2015 年上海市徐汇区诺如病毒感染聚集性疫情流行特征与病原学分析. 职业与健康,2017 (1): 63-65.

DUAN R,LIU J Y,SHEN H, *et al.* Analysis on epidemiological and aetiological characteristics of aggregation epidemic induced by norovirus infection in Xuhui District of Shanghai from 2013-2015.Occupation and Health,2017,(1): 63-65.

[6] Duboiso D B,Matthew M W,Brittan L P, *et al.* Ribonuclease resistant viral RNA standards, United States Patent,5677124,1,1997-10-14.

[7] 何金洋,符林春,陈媛, *等.* 猴免疫缺陷病毒荧光定量聚合酶链反应检测标准品的体外合成. 广州中医药大学学报,2007,24(4): 351-354.

HE J Y,FU L C,CHEN Y,*et al.* In-vitro synthesis of standard simian immunodeficiency virus RNA for quantitative flourescent PCR. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 24(4): 351-354.

[8] Walkerpeach C R,Winkler M,Dubois D B, *et al.* Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus. Clinical Chemistry, 1999, 45(12): 2079-2085.

[9] Pasloske B L, Walkerpeach C R, Obermoeller R D, *et al.* Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(12): 3590-3594.

[10] Zhao L,Ma Y,Zhao S, *et al.* Armored RNA as positive control and standard for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rubella virus. Archives of Virology, 2007, 152(1): 219-224.

[11] Beld M,Minnaar R,Weel J, *et al.* Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(7): 3059-3064.

[12] 李金明,宋如俊,王露楠, *等.* 耐核糖核酸酶内含 HCV RNA 病毒样颗粒的表达. 中华微

生物学和免疫学杂志,2003,(10): 811-813.
LI J M,S R J,W L N, *et al.* Expression of HCV RNA containing and RNase-resisting virus-like particles . Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2003, 23(10): 811-813.
[13] 乔彩霞.H1 和 H3 亚型流感病毒荧光 RT-PCR 及装甲 RNA 标准物质的研究和应用. 中国农业大学, 2014.
SONG C X. Development and application of real-time RT-PCR for detection of H1 and H3 subtype influenza virus and armored RNA standards for influenza A virus. China Agricultural University, 2014.
[14] ISO/T15216-2 2012 Microbiology of food and animal feed —Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR —Part 2:Method for qualitative detection.
[15] GB/T15000.3-2008 标准样品工作导则（3） 标准样品 定值的一般原则和统计方法.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China.GB/T15000.3-2008 Directives for the work of reference materials (3) -Reference material -General and statistical principles for certification.
[16] JJG 1006-1994 一级标准物质.
JJG 1006-1994 Primary standard material.
[17] JJF 1059-1999 测量不确定度评定与表示.
JJF 1059-1999 Evaluation and Expression of Uncertainty in measurement.
[18] Dreier J, Stormer M, Kleesiek K. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse Transcription-PCR Assays. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(9): 4551-4557.
[19] Okello J B, Rodriguez L, Poinar D*, et al.* Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA. Plos One, 2010, 5(11):e13931.
[20]. Lin G, Zhang K, Dong Z*, et al.* Fast preparation of a long chimeric armored RNA as controls for external quality assessment for molecular detection of Zika virus. Clinica Chimica Acta, 2017, 466:138-144.
[21]. Monjure C J, Tatum C D, Panganiban A T *,et al.* Optimization of PCR for quantification of simian immunodeficiency virus genomic RNA in plasma of rhesus macaques (Macaca mulatta) using armored RNA. Journal of Medical Primatology, 2014, 43(1):31.
[22] Cielens I,Ose V,Petrovskis I*, et al.* Mutilation of RNA phage Qβ virus - like particles: from icosahedrons to rods. Febs Letters, 2000, 482(3): 261-4.
[23] 张括,魏玉香,李金明. RNA 噬菌体病毒样颗粒包装机制及其应用研究进展. 微生物与感染,2008,3(2): 111-114.
ZHANG K, WEI J X, LI J M. Packaging of RNA-phage virus-like particles: the molecular mechanism and applications. Journal of Microbes and Infections, 2008, 3(2): 111-114.
[24] 常乐,张括,张瑞, 等. 含轮状病毒 NSP3 基因病毒样颗粒的构建和表达. 北京大学学报: 医学版,2012,44(5): 737-741.
CHANG L,ZHANG K,ZHANG R*, et al.* Construction and expression of virus-like particles containing rotavirus *NSP3 gene.* Journal of Peaking University (Health Sciences), 2012, 44(5): 737-741.

[25] Shen W,Ying L,Li D,*et al.* Preparation and evaluation of MS2 bacteriophage-like particles packaging hepatitis E virus RNA. Fems Microbiology Letters, 2016, 363(20): fnw221.

[26] Yu J,Lai S,Wang X,*et al.* [Analysis of epidemiology characteristics of norovirus among diarrheal outpatients in 27 provinces in China, 2009-2013] . Zhonghua liu xing bing xue za zhi, 2015, 36(3): 199-205.

[27] 魏玉香.内含长片段 RNA 的耐 RNase 病毒样颗粒的原核表达载体构建及表达研究. 中国协和医科大学 北京协和医学院 清华大学医学部 中国医学科学院, 2008.

WEI Y X. Ribonuclease-resistant virus-like particles containing long chimeric RNA sequence produced by two prokaryotic expression system. Peking Union Medical College, 2008.

[28] 邓俊花,林祥梅,吴绍强. 假病毒在 RNA 病毒检测中的应用研究进展. 中国动物检疫,2009,26(11): 67-69.

DENG J H,LIN X M,WU S Q. Advance in research on application of false virus in RNA virus detection .Chinese Journal of Animal Health Inspection,2009,26(11): 67-69.

[29] 徐蕾蕊,魏海燕,林长军, 等. 星状病毒核酸检测标准物质的研制. 食品科学,2016,37(6): 172-177.

XU L R,WEI H Y,LIN C J, *et al.* Development of Astrovirus reference material used in nucleic acid amplification testing, Food Science,2016,37(6):172-177.

[30] 王露楠,吴健民,李金明, 等. 丙型肝炎病毒核酸检测的国家标准物质的研制. 中华检验医学杂志,2006,29(4): 354-357.

WANG L N, WU J M,LI J M, *et al.* Establishment of the first national standard for nucleic acid amplification technology (NAT)assay for HCV RNA. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(4): 354-357.

[31] 蒋玲丽,王华梁,王雪亮, 等. HCV 核糖核酸国家二级标准物质的研制. 临床检验杂志,2016,(1): 60-63.

IANG L L,WANG H L, WANG X L, *et al.* Preparation for national secondary reference material of HCV RNA. Chinese Journal of Clinical laboratory Science, 2016, 34(1): 60-63.

[32] 孙涛,梁成珠,邓明俊, 等. O 型口蹄疫病毒核酸检测标准样品的制备. 动物医学进展,2014,35(2): 45-50.

UN T,LIANG C Z,DENG M J, *et al.* Preparation of O type FMDV reference material used for nucleic acid detection, Progress in Veterinary Medicine,2014,35(2): 45-50.

[33] 那晗,倪长鹏,刘宇, 等. 肠侵袭性大肠埃希氏菌国家核酸标准样品的研制. 食品安全质量检测学报,2015,(1): 140-144.

NA H,NI C P,LIU Y, *et al.* Development of Enteroinvasive Escherichia coli nucleic acid reference material, Journal of Food Safety and Quality,2015,6(1): 140-144.